Aus dem pharmakologischen Institut München
Vorstand: Prof. Dr. v. Tappeiner.

Ueber den Einfluß kleiner Mengen von Cyankalium bezw. Blausäure auf die Sensibilisierung durch fluoreszierende Stoffe (Eosin).

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

in der

gesamten Medizin

einer

hohen medizinischen Fakultät

der

Kgl. Bayer. Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Hans Otto Neresheimer
aus München.

MÜNCHEN 1917.
Druck der Kgl. Hofbuchdruckerei Kastner & Callwey.

Aus dem pharmakologischen Institut München
Vorstand: Prof. Dr. v. Tappeiner.

Ueber den Einfluß kleiner Mengen von Cyankalium bezw. Blausäure auf die Sensibilisierung durch fluoreszierende Stoffe (Eosin).

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

in der

gesamten Medizin

einer

hohen medizinischen Fakultät

der

Kgl. Bayer. Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Hans Otto Neresheimer
aus München.

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

MÜNCHEN 1917.
Druck der Kgl. Hofbuchdruckerei Kastner & Callwey.

Gedruckt mit Genehmigung der medizinischen Fakultät
der Universität München.

Referent: Herr Prof. Dr. von Tappeiner.

Im Jahre 1911 erschien in den Comptes rendus Hebdomadaires des séances et mémoires de la Société de Biologie, (63ème Année), Tome premier, eine vorläufige Mitteilung von Anna Drzewina, betitelt: „Action du Cyanure de Potassium sur des animaux exposés a la lumière". Die Anregung zu dieser Arbeit gaben Experimente von Loeb, der die Wirkung kleiner Cyankalimengen auf unbefruchtete Eier genau studiert hat. Es gelang Loeb, reife unbefruchtete Eier, die unter normalen Verhältnissen im Meerwasser regelmäßig innerhalb kurzer Zeit zugrunde gehen, durch Hinzufügen kleiner Cyankalimengen zu diesem Wasser nicht nur mehrere Tage am Leben zu erhalten, sondern auch bei nach dieser Zeit erfolgter Befruchtung zur normalen Entwicklung zu bringen. Denselben Effekt erreichte er durch Entfernung des Sauerstoffes aus dem Meerwasser.

Ebenso gelang es Loeb, die tödliche Wirkung hypertonischer, hyperalkalischer und gewisser Salzlösungen, wie LiCl, NaCl, KCl usw. auf unbefruchtete Eier entweder aufzuheben oder hinauszuschieben.

Anna Drzewina hat nun an der Biologischen Station von Arcachon die Wirkung des Cyankaliums auf verschiedene niedrige Organismen, hauptsächlich Coelenteraten, Echinodermen,

Würmer, Mollusken, Crustaceen und einige Fische untersucht und berichtet in ihrer vorläufigen Mitteilung über den Einfluß des Cyans auf Tiere, die der Lichtwirkung ausgesetzt wurden.

Es ist eine bekannte Erscheinung, daß niedrige Organismen durch lebhaftes Licht eine Schädigung erfahren, die zu einer Art Lähmung und schließlich zum Tod des Organismus führt. Verschiedene Autoren haben diese Wirkung auf eine Beschleunigung mancher chemischen Reaktionen und speziell des Oxdationsvorgangs bezogen. Insofern ist es erklärlich, wenn Cyan, dem die Eigenschaft zugeschrieben wird, die Oxydation zu hemmen, die Lichtwirkung bis zu einem gewissen Grad herabsetzt oder aufhebt.

Was nun die Versuche selbst betrifft, so werden sie folgendermaßen beschrieben:

„J'ai pris deux lots de Convoluta: le lot A a été placé dans une boite de Pétri (sans Vouvercle) avec 50 centimètres cubes d'eau de mer; le lot B, dans les mêmes conditions, mais en ajoutant à l'eau 1 centimètre cube de KCN à $^1/_{20}$ p. 100. Les deux lots ont été exposés à la lumière solaire directe (sur fond blanc). Déjà, au bout d'une demi-heure, quelquefois plus tôt, le contraste entre les deux lots est des plus nets: dans le lot témoin, les animaux sont recroquebillés sur euxmêmes, alors que dans le lot B ils gardent leur aspect normal en forme de longs bâtonnets, et se déplacent activement. Après une heure d'insolation, on les remet à la lumière diffuse: les témoins continuent à être ratatinés et commencent bientôt à s'agglutiner en amas, ce

qui précède d'habitude de mort; dans le lot B les animaux sont allongés et continuent à se déplacer."

Weitere Versuche mit derselben oder der halben Dosis KCN ergaben die nämlichen Resultate. Bei weniger lebhaftem Licht trat der Unterschied später hervor.

Hier sei noch eine Bemerkung zitiert, auf die später zurück zu kommen sein wird:*) „Il est à noter cependant que dans d'autres localités, et à d'autres saisons le contraste peut-être moins marqué; ainsi en avril dernier sur les côtes de Bretagne, j'ai constaté que les convoluta sont plus resistantes à l'action de la lumière."

Anna Drzewina hat ihre Experimente dann auch mit anderen Versuchstieren angestellt:

„Dans une expérience faite avec des Mollusques de l'espèce Haminea navicula, l'effet en quelque sorte préservateur du Cyanure a été très net (dans le natur, les Haminea, comme les convoluta échappent à l'action trop vive du soleil en s'enfouissant dans le sable). La dose de cyanure à $^1/_{20}$ p. 100 a été 2 centimètres cubes d'eau. Les animaux ont été insolés, une demi-heure un jour, et une heure le lendemain. Les témoins paraissent supporter très mal l'insolation: ils se retractent et restent immobiles pendant toute la durée de l'expérience; dès le lendemain il y a des morts, et les jours suivants, malgré qu'on les maintienne à la lumière diffuse, et que l'eau est renouvelée, ils ne parviennent pas à se remettre, et après quatre

*) Vergl. Seite 22, Anmerkung.

à cinque jours tous sont morts. Or, dans l'eau au cyanure (également renouvelée), les animaux continuent à garder leur aspect normal, se déplacent, et même après six jours il n'y a pas encore de morts. Avec des Branchellions, Vers parasites de la Torpille, j'ai obtenu des effets analogues.

Nach diesen Resultaten war es naheliegend, die Versuche auf andere Zellen auszudehnen, und zwar wurden hiezu einerseits Paramäcien, andererseits Zellen höher organisierter Tiere (rote Blutkörperchen von Säugetieren) gewählt.

Zugleich sollte geprüft werden, ob die Lichtwirkung auf sensibilisierte Zellen in ähnlicher Weise durch kleine KCN-Dosen abgeschwächt wird. Eine solchen Sensibilisierung findet statt durch Zusatz fluoreszierender Lösungen zu den zu belichtenden Objekten. Diese Sensibilisierung wird als photodynamische Wirkung bezeichnet. Photodynamisch beeinflußbar sind außer den Zellen auch die Fermente. Die Lichtempfindlichkeit einer Invertaselösung z. B. wird durch Eosinzusatz um das 400fache gesteigert. Es wurde deshalb auch Invertase zu den folgenden Versuchen herangezogen.

Im folgenden soll nun über die diesbezüglichen Versuche im einzelnen berichtet werden.

Doch bevor ich hiemit beginne, sei der angenehmen Pflicht genügt, Herrn Professor von Tappeiner und Herrn Professor Jodlbauer für die Überlassung des Themas und die freundliche Unterstützung mit Rat und Tat meinen besten Dank auszusprechen.

A. Versuche mit Invertase.

Das Ferment Invertase hat bekanntlich die Eigenschaft, das rechtsdrehende Disaccharid Saccharose (Rohrzucker) in seine beiden Komponenten, die Monosaccharide Dextrose und Lävulose zu zerlegen. Die Dextrose dreht die Ebene des polarisierten Lichtes nach rechts, die Lävulose nach links, und zwar beträchtlich stärker nach links als die Dextrose nach rechts. Läßt man also auf eine Rohrzuckerlösung, deren Rechtsdrehung man polarimetrisch bestimmt hat, Invertase einwirken, so wird, der fortschreitenden Invertierung entsprechend, die Rechtsdrehung der Lösung abnehmen und bei genügend langer Einwirkung der Fermente einer Linksdrehung Platz machen. Diese Linksdrehung wird nach einer gewissen Zeit ihr Maximum erreichen, dann nämlich, wenn alle Saccharose in Dextrose und Lävulose gespalten ist.

Der Vorgang der Invertierung ist hier an das Vorhandensein eines wirksamen Fermentes gebunden. Wird das Ferment irgendwie in seiner Wirksamkeit abgeschwächt wie durch Erwärmung oder Bestrahlung, so nimmt seine invertierende Fähigkeit ab.

Die geringere Invertierung zeigt sich im Polarisationsapparat in einer entsprechend kleineren Linksdrehung, so daß wir also in dieser, bei Vergleich mit einer durch ungeschädigtes Ferment

hervorgebrachten, ein zuverlässiges Maß für die Schädigung besitzen.

Unter Zugrundelegung dieser Tatsachen wurden die im folgenden näher beschriebenen Versuche vorgenommen.

Einige allgemeine Vorbemerkungen seien vorausgeschickt: Wegen der bekannten Empfindlichkeit der Invertase gegen Alkali kam zunächst nicht KCN selbst in Verwendung, sondern verdünnte Blausäure. Diese wurde stets auf die gleiche Weise aus 10 g 100prozentigem in 10 ccm Aqu. dest. gelöstem KCN durch Einfließenlassen von 10 g konz. H_2SO_4, gemischt mit 10 g Wasser, freigemacht, in der Kühlvorlage verdichtet und in Eis aufgefangen. Sie ist der Einfachheit halber als 100prozentig angenommen, obwohl sie in Wirklichkeit weniger konzentriert ist.

Die verwendete Eosinlösung war $^1/_{100}$ molar. (somit 0,692 g Eosin in 100 Wasser).

Die zu den Versuchen benutzte Invertase war im Laboratorium dargestellt und erwies sich als sehr wirksam. Von ihr wurden 1prozentige Lösungen verwendet.

Die Versuchsanordnung war dabei im allgemeinen folgende: Reagensgläser gleichen Kalibers wurden mit gleichen Mengen Invertaselösung beschickt und erhielten teils nur einen bestimmten Zusatz von Eosinlösung (0,1 Eosinlösung auf 10 Fermentlösung) — somit Konzentration des Eosins = 1—10000 mol. —, teils dazu noch eine bestimmte Menge Blausäure (später auch KCN). So wurden immer je 2 Gläser in derselben Weise beschickt und davon je eins zur

Kontrolle im Dunkeln gehalten, während das andere an einem Nordfenster des Instituts mehrere Tage dem zerstreuten Tageslicht ausgesetzt war. Um die Belichtung möglichst gleichmäßig zu gestalten, tauschten die Gläser mehrmals ihre Plätze untereinander, so daß jedes an jeder Stelle die gleiche Zeit dem Licht ausgesetzt war.

Um die flüchtige Blausäure nicht entweichen zu lassen, waren sämtliche Gläser verschlossen.

Nach genügend langer Einwirkung des Lichtes wurde jeweils aus den im Dunkeln gehaltenen und den belichteten Proben eine bestimmte Menge mit einem abgemessenen Volumen einer ca. 15-prozentigen Rohrzuckerlösung gemischt und 5—6 Stunden im Dunkeln bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Nach dieser Zeit erfolgte die Zerstörung der Fermente durch Abkochen und die Bestimmung des Invertierungsgrades mittels Polarisation.

Versuchsreihe I.

	Invertaselösung in ccm	Eosinlösung in ccm	10% Blausäure in ccm	Wasser in ccm	Abgelesene Drehung	Berechnete Invert. pCt.	Schädigung pCt.
1. Dunkel	10,0	0,1	0	0,5	+1°23′	100	0
2. Hell	10,0	0,1	0	0,5	+6°23′	21	79
3. Dunkel	10,0	0,1	0,1 =1:1000	0,4	+1°43′	95	5
4. Hell	10,0	0,1	0,1 =1:1000	0,4	+5°27′	36	64
5. Dunkel	10,0	0,1	0,5 =1:200	0	+1°48′	93	7
6. Hell	10,0	0,1	0,5 =1:200	0	+5°10′	38	62

Belichtungsdauer: 2 Tage (b. bedecktem Himmel).
Es wurden je 2,5 ccm der Lösungen versetzt mit
je 7,5 ccm einer ca. 15proz. Rohrzuckerlösung.
Drehung dieses Gemisches vor der Invertierung:
$+ 7^0 43'$.
Einwirkung der Invertase auf Rohrzuckerlösung:
ca. 6 Stunden.

Bei der Berechnung der Invertierungsgröße wurde die Invertierung der im Dunkeln gehaltenen Lösung ohne Blausäure (Glas 1) als 100-prozentig angenommen. Dabei ergab sich für die Berechnung der beiden anderen Dunkelversuche, die Blausäure enthielten, ein Zurückbleiben von 5 bezw. 7%, das schlechthin als Wirkung des verhältnismäßig großen Blausäurezusatzes erklärt werden könnte. Es ist jedoch eine derartige Schädigung durch Blausäurezusatz selbst bei noch höheren Konzentrationen (bei Dunkelversuchen Nb!) in der Folge nicht mehr beobachtet worden. Vielmehr ist es wahrscheinlich, daß es sich hier um einen Versuchsfehler handelt, der sich in der Tat ohne Schwierigkeit daraus ableiten läßt, daß gerade bei diesem Versuch I vor der Polarisation das Ferment zufällig nicht durch Abkochen unwirksam gemacht wurde. Dadurch ist in einzelnen Gläsern, die später zur Ablesung kamen, die Invertierung noch um einige Prozente weiter fortgeschritten.

Die unter „Drehung" eingetragenen Werte sind als arithmetisches Mittel aus 4 Ablesungen gefunden.

Vergleicht man nun die gefundenen Zahlen, so ergibt sich, daß die Invertaselösung im Licht

(2) die größte Schädigung (79%) erfahren hat, während die Lösungen, denen Blausäure zugesetzt war, eine um 15 bezw. 17% geringere Schädigung aufweisen.

Es zeigt sich somit, daß Blausäure zwar nicht imstande ist, der Invertase gegenüber einen absoluten Schutz gegen das System Licht + Eosin zu leisten, trotzdem aber die photodynamische Wirkung abschwächt.

Diese Erfahrung ließ sich durch weitere Versuche bestätigen.

Versuchsreihe II.

Belichtungsdauer: 2 Tage (b. bedecktem Himmel).
Je 5 ccm der Lösungen wurden versetzt mit je 5 ccm einer ca. 15 proz. Rohrzuckerlösung.
Drehung dieses Gemisches vor der Invertierung: + 5° 30′.
Einwirkung der Invertase auf Rohrzuckerlösung: $5^1/_2$ Stunden.

a) Blausäureversuch.

	Invertase lösung in ccm	Eosinlösung in ccm	10% Blausäure in ccm	Wasser in ccm	Abgelesene Drehung	Berechnete Invert. pCt.	Schädigung pCt.
1. Hell	10,0	0,1	0,5 =1:200	0,9	+2°30′	52	48
2. Dunkel	10,0	0,1	0,5 =1:200	0,9	—0°24′	100	0
3. Hell	10,0	0,1	1,0 =1:100	0,4	+4°6′	24	76
4. Dunkel	10,0	0,1	0,1 =1:100	0,4	—0°10′	100	0
5. Hell	10,0	0,1	0	1,4	+3°6′	42	58
6. Dunkel	10,0	0,1	0	1,4	—0°16′	100	0

b) Cyankaliversuch.

	Invertaselösung in ccm	Eosinlösung in ccm	10 % KCN in ccm	Wasser in ccm	Abgelesene Drehung	Berechnete Invert pCt.	Schädigung pCt.
7. Hell	10,0	0,1	0,5 =1:200	0,9	+5°40′	0	100
8. Dunkel	10,0	0,1	0,5 =1:200	0,9	+5°40′	0	100

Bei diesem Versuch, dessen Anordnung im allgemeinen der des ersten entsprach, boten mehrere Proben Unterschiede gegen das gewöhnliche Verhalten dar, die zum Teil sich schon äußerlich in recht auffallender Weise zeigten.

So nehmen beim Zufügen der Blausäure die Proben 3 und 4 fast augenblicklich eine intensiv rote Farbe an, zugleich tritt eine leichte Trübung auf, die (nach Busk) von Eiweißverbindungen des Eosins herrührt. Dagegen erscheinen die Proben 1 und 2 gegen 5 und 6 nicht verändert, da diese niedrige Konzentration der Blausäure die Erscheinung noch nicht hervorruft.

Diese Veränderung in der Farbe des Eosins rührt sicher von Eiweißstoffen her, die der Invertase anhaften. Sie tritt nämlich in derselben Weise ein, wenn dem Eosin kleine Mengen Serum zugesetzt werden, worauf Busk allerdings nur kurz hinweist. Daß sie bei den Blausäureversuchen besonders deutlich in Erscheinung trat, hängt mit dem Säurecharakter der Blausäure zusammen, denn wenn man zu einer Mischung von Eosin und kleinen Mengen Serum irgend eine

verdünnte Säure hinzufügt, wird der Rotton noch weiter verstärkt.

Beim Zusatz des KCN (Probe 7 und 8) fällt sofort ein voluminöser Niederschlag in dicken Flocken zu Boden. Beide Proben sind deutlich heller gefärbt als die Kontrollproben ohne solchen Zusatz.

Nach 2 tägiger Belichtung zeigt 7 eine beträchtliche Abblassung gegenüber der Dunkelprobe 8, die von der stärkeren Bleichung des Eosins in alkalischer Lösung herrührt. Im übrigen ist, wie aus dem Protokoll ohne weiteres hervorgeht, die Invertase in 7 und 8 offenbar durch den Cyankalizusatz unwirksam gemacht worden, so daß ein weiteres Eingehen auf dieselben unnötig erscheint.

Die Dunkelprobe 6 erwies sich bakteriell infiziert und ließ bei mikroskopischer Untersuchung zahlreiche bewegliche, stäbchenförmige Bakterien erkennen. Auf die Invertierung blieb dies jedoch, wie aus dem Protokoll ersichtlich, ohne Einfluß.

Die Differenzen von einigen Minuten Drehung zwischen den Versuchen Nr. 2, 4 und 6 wurden, weil innerhalb der Fehlergrenzen liegend, bei Berechnung der Resultate nicht in Betracht gezogen und die Invertierung dieser drei Dunkelproben gleichmäßig als 100% angenommen.

Dagegen bestehen zwischen den belichteten Proben erhebliche Differenzen. Die belichtete Probe (5) ohne Blausäurezusatz weist eine Invertierung von 42% auf, mithin besteht eine Schädigung von 58%. Die belichtete Probe (1) mit einem

Blausäurezusatz von 0,5 ccm, somit 0,5% im Gemenge, zeigt eine um 10% höhere Invertierung und dementsprechend um 10% geringere Schädigung als 5, ein Resultat, das mit dem in Versuchsreihe I gewonnenen in vollkommenem Einklang steht.

Dagegen beträgt die Invertierung bei Probe 3, mit einem Blausäurezusatz von 1,0 ccm, somit 1% im Gemenge, nur 24%, die Schädigueng also 76%. Diese Schädigung übertrifft jene der blausäurefreien Probe (5) um 18%, die der Probe mit dem nur um die Hälfte geringeren Blausäurezusatz (1) sogar um 28%!

Bei der im Dunkeln gehaltenen Probe 4, die den gleichen Blausäurezusatz wie 3 enthielt (1 : 100), war nicht die geringste Schädigung nachzuweisen.

Aus diesen Ergebnissen muß der Schluß gezogen werden, daß der durch kleine Blausäuremengen herbeigeführte Schutz gegenüber Lichtschädigung bei Erhöhung der Konzentration fortfällt und sogar das Gegenteil eintritt: Steigerung der Lichtwirkung.

Eine Erklärung dieser Erscheinung ist zurzeit nicht zu geben, es sei nur kurz darauf hingewiesen, daß bei den späteren Versuchen mit Paramaecium candatum dieselbe Erscheinung zu beobachten war, ohne daß äußerlich eine Änderung des Eosins in Farbe oder dergleichen sich bemerkbar machte.

Versuchsreihe III.

Belichtungsdauer: 3 Tage bei bedecktem Himmel.
Je 2,5 ccm der Lösungen wurden mit je 7,5 ccm ca. 15 proz. Rohrzuckerlösung versetzt.

Drehung dieses Gemisches vor der Invertierung: $+ 7^0 40'$.

Einwirkungsdauer der Invertase auf Rohrzuckerlösung: 6 Stunden.

a) Blausäure-Versuch.

	Invertaselösung in ccm	1:100 Eosinlösung in ccm	1% Blausäure in ccm	Wasser in ccm	Abgelesene Drehung	Berechnete Invert. pCt.	Schädigung pCt.
1. Hell	5,0	0,05	0,5 =1:1000	0	$+4^0 44'$	73	27
2. Dunkel	5,0	0,05	0,5 =1:1000	0	$+3^0 11'$	—	—
3. Hell	5,0	0,05	0,05 =1:10000	0,45	$+4^0 30'$	78	22
4. Dunkel	5,0	0,05	0,05 =1:10000	0,45	$+3^0 35'$	100	0
5. Hell	5,0	0,05	0	0,5	$+5^0 56'$	44	56
6. Dunkel	5,0	0,05	0	0,5	$+3^0 38'$	100	0

b) Cyankali-Versuch.

	Invertaselösung in ccm	1:100 Eosinlösung in ccm	1% KCN in ccm	Wasser in ccm	Abgelesene Drehung	Berechnete Invert. pCt.	Schädigung pCt.
7. Hell	5,0	0,05	0,5 =1:1000	0	$+7^0 40'$	0	100

	Invertaselösung in ccm	1:100 Eosinlösung in ccm	KCN in ccm	Wasser in ccm	Abgelesene Drehung	Berechnete Invert. pCt.	Schädigung pCt.
8. Dunkel	5,0	0,05	0,5 =1:1000	0	+6°33′	27	73
9. Hell	5,0	0,05	0,05 =1:10000	0,45	+5°25′	56	44
10. Dunkel	5,0	0,05	0,05 =1:10000	0,45	+3°39′	100	0

Die Proben sind diesmal infolge des kleinen Blausäure- bezw. Cyankalizusatzes für das bloße Auge alle gleichmäßig gefärbt und bieten auch sonst keine Besonderheiten. Eine bakterielle Infektion wurde durch Zusatz von je 3 Tropfen Toluol in jedes Reagensglas verhindert.

Die Differenz von etwa 26′ zwischen Probe 2 und den Dunkelproben 4, 6 und 10, die unter sich genau übereinstimmen, konnte nur durch einen Versuchsfehler erklärt werden. Es wurden deshalb für Versuch 1 die Dunkelversuche 4 und 6 zum Vergleich herangezogen.

Die Konzentrationen 1 : 1000 bezw. 1 : 10000 der Blausäure zeigten eine deutliche Hemmung der Lichtwirkung, und zwar von 29 bezw. 34%. Sie ist also noch beträchtlich größer als bei den früher verwendeten höheren Konzentrationen.

Bei Zusatz von Cyankali 1 : 1000 wird das Ferment schon im Dunkeln sehr stark (73%) geschädigt. Im Licht wird bei Gegenwart von 1 : 1000 Cyankali das Ferment völlig zerstört.

In der Konzentration von 1 : 10000 schädigt KCN im Dunkeln nicht mehr. Im Licht hat es sogar eine Schutzwirkung von ca. 12%.

Es ist also daraus ersichtlich, daß auch KCN in Konzentrationen, die keine Schädigung des Ferments mehr verursachen, zur Hemmung der Lichtwirkung führen kann.

Zusammenfassung der Resultate.

Betrachtet man die Ergebnisse dieser drei Versuchsreihen zusammen, so findet man kurz folgendes:

Blausäure bleibt in der Konzentration von 1 : 10000 bis 1 : 100 im Dunkeln ohne nachweisbare Wirkung auf Invertase. Bei Belichtung unter Sensibilisierung mit Eosin ist bei Konzentration von 1 : 10000 bis 1 : 200 eine deutliche Schutzwirkung zu konstatieren, und zwar stellt sich diese anscheinend bei der niedrigsten Konzentration am höchsten. Hohe Blausäurekonzentration (1 : 100) schützt nicht mehr vor der Lichtwirkung, sondern verstärkt diese im Gegenteil noch.

Cyankalium zerstört in der Konzentration von 1 : 200 das Ferment schon im Dunkeln völlig, von 1 : 1000 zum größten Teil, 1 : 10000 führt zu keiner Schädigung mehr. Diese das Ferment im Dunkeln nicht mehr schädigende Konzentration hemmt die sensibilisierende Wirkung des Eosins ebenso wie die höheren Konzentrationen der Blausäure.

Vor Schluß dieses Kapitels sei noch daran erinnert, daß bereits Stoffe bekannt sind, die die sensibilisierende Wirkung abschwächen. A. Jodlbauer*) und v. Tappeiner haben die Beobach-

*) A. Jodlbauer, Strahlentherapie, II, 1, 78 (1913).

tung gemacht, daß eine mit Rohrzucker versetzte Invertaselösung, wobei also der Invertierungsprozeß während der Belichtung verlief, weniger geschädigt wurde als eine Invertaselösung allein. Sie schlossen daraus, daß das „tätige" Ferment schwerer angreifbar sei als das „ruhende". Diese Schlußfolgerung ist aber durch weitere Untersuchungen von Jodlbauer unhaltbar gemacht worden, da auch der Zusatz anderer Kohlehydrate, auf die Invertase nicht fermentierend wirken kann, die Lichtwirkung hemmte.

B. Versuche mit Paramaecium candatum.

Bei den Lichtversuchen mit Paramaecium candatum, auf die im folgenden näher eingegangen werden soll, war vorher zu prüfen, wie die Tiere die erforderlichen KCN- bezw. HCN-Konzentrationen im Dunkeln ertragen würden, zumal ihre Empfindlichkeit gegen Alkalien und Säuren bekannt ist. Anna Drzewina hat zu ihren Versuchen an Meertieren KCN 1 : 100000 beziehungsweise 1 : 200000 verwendet. Die gegenwärtigen Versuche wurden mit denselben sowie höheren und geringeren Konzentrationen angestellt. Ein Vorversuch verschaffte Klarheit darüber, daß die Paramäzien KCN- bezw. HCN-Konzentrationen von 1 : 100000 bis 1 : 5000 ohne erhebliche Schädigung im Dunkeln mehrere Tage hindurch vertrugen, während sie bei 1 : 1000 bereits nach relativ kurzer Zeit zum größten Teil zugrunde gingen.

Das Versuchsmaterial wurde in ungedeckten Uhrschälchen, die auf weißem Grund standen, der Belichtung ausgesetzt.

Im direkten Sonnenlicht gingen die mit Eosin sensibilisierten Tiere derart rasch zugrunde, daß es unmöglich war, geringe Zeitunterschiede bei ihrem Tode mit Genauigkeit festzustellen. Es wurde deshalb in der Folge nur zerstreutes Tages-

licht verwendet. Die Resultate sind im einzelnen aus den Versuchsprotokollen ersichtlich.

Die in der 1. und 2. Rubrik aufgeführten Zahlen beziehen sich auf Kubikzentimeter. Die dritte Rubrik gibt die KCN- bezw. HCN-Konzentrationen im Gemenge an.

I.

Paramaec. Kultur	Eosin 1;100	KCN	Belichtet im zerstr. Tagesl.	Dunkel
10,0	0,1	1 : 100 000	tot nach 30′	leb. nach 48 h
10,0	0,1	1 : 50 000	„ „ 30′	„ „ „
10,0	0,1	1 : 25 000	„ „ 35′	„ „ „
10,0	0,1	0	„ „ 30′	„ „ „

II.

Paramaec. Kultur	Eosin 1:100	Blausäure	Belichtet	Dunkel
10,0	0,1	1 : 100 000	tot nach 100′	leb. nach 48 h
10,0	0,1	1 : 50 000	„ „ 100′	„ „ „
10,0	0,1	1 : 25 000	„ „ 110′	„ „ „
10,0	0,1	0	„ „ 100′	„ „ „

III.

Paramaec. Kultur	Eosin 1:100	Blausäure	Belichtet	Dunkel
10,0	0,1	1 : 100 000	tot nach 120′	leb. n. 5×24 h
10,0	0,1	1 : 50 000	„ „ 85′	„ „ „ „
10,0	0,1	1 : 25 000	„ „ 70′	„ „ „ „
10,0	0,1	0	„ „ 110	„ „ „ „

IV.

Paramaec. Kultur	Eosin 1:100	KCN	Belichtet	Dunkel
10,0	0,1	1 : 100 000	tot nach 90′	leb. nach 48 h
10,0	0,1	1 : 50 000	„ „ 65′	„ „ „
10,0	0,1	1 : 25 000	„ „ 80′	„ „ „
10,0	0,1	0	„ „ 50′	„ „ „
10,0	0,1	0	„ „ 50′	

V.

Paramaec. Kultur	Eosin 1 : 100	KCN	Belichtet	
10,0	0,1	1 : 100 000	tot nach 95′	
10,0	0,1	1 : 50 000	„ „ 95′	
10,0	0,1	1 : 25 000	„ „ 95′	
10,0	0,1	0	„ „ 55′	

VI.

Paramaec. Kultur	Eosin 1 : 100	KCN	Belichtet	Dunkel
10,0	0,1	1 : 10 000	tot nach 100′	leb. n. 3×24 h
10,0	0,1	0	„ „ 105′	„ „ „

VII.

Paramaec. Kultur	Eosin 1 : 100	Blausäure	Belichtet	Dunkel
10,0	0,1	1 : 100 000	tot nach 85′	leb. n. 10×24 h
10,0	0,1	1 : 50 000	„ „ 90′	„ „ „
10,0	0,1	1 : 25 000	„ „ 85′	„ „ „
10,0	0,1	1 : 10 000	„ „ 70′	„ „ „
10,0	0,1	1 : 5 000	„ „ 55′	„ „ „
10,0	0,1	0	„ „ 85′	„ „ „
10,0	0,1	0	„ „ 70′	

VIII.

Paramaec. Kultur	Eosin 1 : 100	KCN	Belichtet	Dunkel
10,0	0,1	1 : 2 000 000	tot nach 210′	leb. nach 48 h
10,0	0,1	1 : 1 000 000	„ „ 210′	„ „ „
10,0	0,1	1 : 500 000	„ „ 215′	„ „ „
10,0	0,1	1 : 100 000	„ „ 205′	„ „ „
10,0	0,1	0	„ „ 210′	„ „ „
10,0	0,1	0	„ „ 210′	„ „ „

IX.

Paramaec. Kultur	Eosin 1 : 100	Blausäure	Belichtet	Dunkel
10,0	0,2	1 : 2 000 000	tot nach 130′	leb. nach 48 h
10,0	0,2	1 : 1 000 000	„ „ 130′	„ „ „
10,0	0,2	1 : 500 000	„ „ 130′	„ „ „
10,0	0,2	1 : 100 000	„ „ 130′	„ „ „
10,0	0,2	0	„ „ 120′	„ „ „
10,0	0,2	0	„ „ 130′	„ „ „

X.

Paramaec. Kultur	Eosin	KCN	Belichtet	Dunkel
10,0	0	1 : 100 000	tot n. 6×24 h	leb. n. 8×24 h
10,0	0	1 : 50 000	„ „ 6×24 h	„ „ „
10,0	0	1 : 25 000	„ „ 6×24 h	„ „ „
10,0	0	0	„ „ 6×24 h	„ „ „
10,0	0	0	„ „ 7×24 h	

XI.

Paramaec. Kultur	Eosin	Blausäure	Belichtet	Dunkel
10,0	0	1 : 100 000	tot n. 5×24 h	leb. n. 8×24 h
10.0	0	1 : 50 000	„ „ 7×24 h	„ „ „
10,0	0	1 : 25 000	„ „ 5×24 h	„ „ „
10,0	0	0	„ „ 4×24 h	„ „ „

Bei Betrachtung dieser Versuche ist es vor allem auffallend, daß die Resultate so außerordentlich ungleichmäßig sind, ja sich zum Teil direkt widersprechen. In Versuch I und II leben die Paramäzien bei einer KCN- bezw. HCN-Konzentration von 1 : 25000 länger als ohne Cyanzusatz. Bei 1 : 50000 und 1 : 100000 gehen sie jedoch ebenso schnell zugrunde als ohne Giftzusatz. In Versuch III hinwiederum überlebten die Para-

mäzien bei 1 : 100000 (HCN) alle anderen, während die bei 1 : 50000 und 1 : 25000 sogar um 25 bezw. 40 Minuten früher tot waren als im Kontrollversuch.

In Versuch IV wurden zwei Kontrollschälchen mit Paramäzien ohne KCN-Zusatz aufgestellt, um zu sehen, ob vielleicht auch unter diesen beiden Differenzen aufträten, was die Beurteilung der Resultate naturgemäß noch unsicherer gestalten würde. Bei diesem Versuch zeigten sich keine. Dagegen war eine Schutzwirkung des KCN in allen drei verwendeten Konzentrationen nachweisbar, jedoch mit unerklärlicher Ungleichmäßigkeit.

Die zu diesem letzteren Versuch (IV) verwendeten, im Dunkeln gehaltenen Kontrollen wurden nach zwei Tagen dem Licht ausgesetzt. Solange sie im Dunkeln waren, zeigten sie keine erkennbare Schädigung. Im Licht dagegen (Versuch V) war eine Schutzwirkung durch KCN vorhanden, wie sie bei keiner Versuchsanordnung mit gleicher Deutlichkeit und Regelmäßigkeit beobachtet wurde. Die Paramäzien ohne KCN-Zusatz waren nach 55 Minuten tot, Die mit KCN in der Konzentration von 1 : 100000, 1 : 50000, 1 : 25000 überlebten diese sämtlich um 40 Minuten! Man könnte somit vermuten, daß das KCN eine Schutzwirkung erst dann deutlich zeigt, wenn es vorher längere Zeit auf die Tiere eingewirkt hat bezw. diese sich an den ihnen fremden Körper gewöhnt haben.

Die bisher in manchen Fällen beobachtete schützende Wirkung ließ sich in der Folge in keiner Weise mehr betätigen. Zunächst traten bei

den doppelten Kontrollen ohne Cyanzusatz zeitliche Differenzen beim Absterben der Tiere bis zu 15 Minuten auf (s. Versuch VII und IX), obgleich die Schälchen auf gleichmäßig weißem Grunde standen und von 5 zu 5 Minuten ihre Plätze tauschten, um eine möglichst gleichmäßige Belichtung zu garantieren.

Diese Differenzen legen für die Bewertung der gesamten Ergebnisse große Vorsicht nahe.

Nur eines scheint ziemlich klar aus Versuch VII hervorzugehen, daß nämlich höhere Blausäurekonzentrationen (von 1 : 5000) vielleicht auch schon KCN 1 : 10000 (s. auch VI!), die im Dunkeln scheinbar unschädlich sind, im Licht schädigend wirken und die Lichtwirkung verstärken.*)

Es dürfte hier doch wohl eine Summation von zwei Schädigungen vorliegen, einerseits der des Lichtes, andererseits der HCN. Daß diese im Dunkelversuch nicht zum Ausdruck kommt, erklärt sich aus der Beurteilungsmethode, die nur schwere Schädigungen (Einschränkung bezw. Einstellung der Bewegung, Auflösung usw.) erkennen läßt.

Die zu den Versuchen VIII und IX verwendeten Konzentrationen von 1 : 1000000, 1 : 2000000 und 1 : 500000 sind sicher nach jeder Richtung wirkungslos.

Zuletzt sei noch auf die Versuche X und XI hingewiesen, bei denen KCN bezw. HCN ohne Eosinzusatz verwendet wurden. Auch hier waren

---

*) Vergl. auch Seite 9 Invertaseversuch II, und Seite 11.

keine einheitlichen Resultate zu erzielen, und auch hier bestanden wieder Differenzen zwischen den Kontrollen. Die Versuche dauerten allerdings mehrere Tage. Die Versuche I bis VI wurden im Hochsommer, VII bis XI dagegen im Spätherbst vorgenommen.

Zusammenfassung.

Aus so widersprechenden Resultaten bestimmte Schlüsse zu ziehen, ist, wie schon angedeutet, unmöglich. Wenn eine Schutzwirkung des Cyans bei Paramäzien gegen die Eosin-Lichtwirkung vorhanden ist, so ist sie jedenfalls nur in wenigen Fällen nachweisbar und sehr unbeständig und unvollkommen.

Im übrigen sei daran erinnert, daß auch Anna Drzewina Ungleichmäßigkeiten in den Resultaten, allerdings kaum in solchem Umfang, gesehen hat,*) die nach ihrer Angabe mit den Jahreszeiten zusammenhingen.

---

*) Siehe Seite 3.

C. Versuche mit gewaschenen roten Blutkörperchen.

Als weiteres und letztes Versuchsobjekt dienten rote Blutkörperchen, die nach den Versuchen von Saccaroff-Sachs als gut sensibilisierbare biologische Objekte bekannt sind. Etwa 1 prozentige Aufschwemmungen sorgfältig gewaschener Kaninchen-Blutkörperchen in 0,85 prozentiger Kochsalzlösung wurden mit Eosin allein und Eosin + KCN (HCN), in gleichweiten, abgemessenen Reagensgläsern dem direkten Sonnenlicht ausgesetzt (November, bei sehr niedriger Außentemperatur).

Der Versuchsverlauf ist aus der folgenden Tabelle zu ersehen.

I.

Blut-aufschwg. in ccm	1 pCt. Blausäure in ccm	1/100 mol. Eosin in ccm	Wasser in ccm	Belichtet im direkten Sonnenlicht
10,0	0,1=1:10000	0,05	0	Total-Hämolyse nach 80′
10,0	0,5=1:20000	0,05	0,05	„ „ „ 80′
10,0	0	0,05	0,1	„ „ „ 100′

Blut-aufschwg. in ccm	1 pCt. KCN	1/100 mol. Eosin in ccm	Wasser in ccm	Belichtet im direkten Sonnenlicht
10,0	0,05=1:20000	0,05	0,05	Total-Hämolyse nach 80′
10,0	0,02=1:50000	0,05	0,08	„ „ „ 80′

II.

Blut-aufschwg. in ccm	1 pCt. Blausäure in ccm	1/100 mol. Eosin in ccm	Wasser in ccm	Belichtet bei schwachem Sonnenlicht
10,0	0,01 = 1:100000	0,1	0,01	Total-Hämolyse nach 160′
10,0	0,02=1:50000	0,1	0	„ „ „ 160′
10,0	0	0,1	0,02	„ „ „ 215′
10,0	0	0,1	0,02	„ „ „ 215′

Blut-aufschwg. in ccm	1 pCt. KCN	1/100 mol. Eosin in ccm	Wasser in ccm	Belichtet bei schwachem Sonnenlicht
10,0	0,01 = 1:100 000	0,1	0,01	Total-Hämolyse nach 180′
10,0	0,02=1:50000	0,1	0	„ „ „ 180′

III.

Blut-aufschwg. in ccm	1 pCt. Blausäure in ccm	1/100 mol. Eosin in ccm	Wasser in ccm	Belichtet im direkten Sonnenlicht
10,0	0,1=1:10000	0,1	0	Total-Hämolyse nach 75′
10,0	0,01=1:100 000	0,1	0,09	„ „ „ 75′
10,0	0	0,1	0,1	„ „ „ 150′
10,0	0	0,1	0,1	„ „ „ 150′

Blut-aufschwg. in ccm	1 pCt. KCN	1/100 mol. Eosin in ccm	Wasser in ccm	Belichtet im direkten Sonnenlicht
10,0	0,1=1:10000	0,1	0	Total-Hämolyse nach 70′
10,0	0,01=1:100000	0,1	0,09	„ „ „ 75′

Ein Blick auf diese Versuchsprotokolle zeigt ohne weiteres, daß die Blutproben, denen HCN oder KCN zugegeben waren, beträchtlich früher bei Belichtung der Hämolyse verfielen als die cyanfreien Versuche. Es ist also offenbar, daß hier von einer Schutzwirkung gar keine Rede sein kann, im Gegenteil die Gegenwart des Cyans beschleunigt den Vorgang der Hämolyse.

Besonders deutlich ist dies in Versuch III zu sehen, wo die cyanfreien Proben genau doppelt so lang zur Hämolyse brauchen als die mit KCN bezw. HCN beschrickten. KCN 1:10000 wird sogar noch schneller hämolytisch als alle übrigen Proben.

Zusammenfassung.

Das Ergebnis dieser Arbeit läßt sich dahin zusammenfassen: Blausäure bezw. Cyankali hemmen die Lichtwirkung auf die durch Eosin sensibilisierte Invertase, jedoch nur in sehr beschränktem Maße und nur bei gewisser Konzentration.

Dagegen ist eine solche Hemmung bei den mit Eosin sensibilisierten Paramäzien höchst zweifelhaft. Bei roten Blutkörperchen steigern Blausäure resp. Cyankali die Eosin-Lichtwirkung. Es ergibt sich daraus, daß eine Verallgemeinerung

der von Anna Drzewina gewonnenen Resultate nicht zulässig ist, insbesondere für biologische Objekte, die mit Eosin sensibilisiert waren, nicht ausnahmslos zutrifft.

Literaturverzeichnis:

Anna Drzewina: Action du Cyanure de Potassium sur des animaux exposés à la lumière. (Note préluminaire.) Compt. rend. Soc. biolog. 1911.

H. v. Tappeiner: Die photodynamische Erscheinung. Ergebnisse der Physiologie, Bd. 8, S. 698 f.

H. v. Tappeiner u. A. Jodlbauer: Die sensibilisierende Wirkung fluoreszierender Substanzen. Leipzig 1907. F. C. W. Vogel.

H. v. Tappeiner und A. Jodlbauer: Die Beziehungen zwischen der photodynamischen Wirkung der fluoreszierenden Stoffe und ihrer Fluoreszenz. Strahlentherapie, Bd. II, Heft 1.

A. Jodlbauer: Die Sensiblisierung durch fluoreszierende Stoffe. (Photodynamische Wirkung.) Strahlentherapie, Bd. II, Heft 1.

Dax: Über den Ablauf der photodynamischen Erscheinungen bei alkalischer, neutraler und saurer Reaktion. Dissertation.

G. Busk: Photobiologische Sensibilisatoren. Biochem. Zeitschrift, I.

Lebenslauf.

Ich, Hans Otto Neresheimer, geboren am 16. Januar 1890 als Sohn des Kaufmanns Friedrich Neresheimer zu Amsterdam, bin seit 1903 bayerischer Staatsangehöriger.

1909 bestand ich die Reifeprüfung am Kgl. Maximiliansgymnasium zu München. Von Herbst 1909 bis Sommer 1914 an der Medizinischen Fakultät der Universität München immatrikuliert, bestand ich im Winter 1911/12 die ärztliche Vorprüfung, im Sommer 1914 das Staatsexamen und erhielt damals die Approbation als Arzt.

In meinem militärischen Verhältnis gehörte ich bis Kriegsausbruch der Ersatzreserve an. Am 9. August 1914 wurde ich zum Heeresdienst eingezogen und stehe seit Dezember 1914 als Assistenzarzt d. R. im Felde.